PUT/EFZUU 4 /1 9. 4 /1 2004

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP04/7248

REC'D 1 3 SEP 2004

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 29 860.6

Anmeldetag:

02. Juli 2003

Anmelder/Inhaber:

ATTO-TEC GmbH, 57076 Siegen/DE

Bezeichnung:

Sulfonamidderivate polycyclischer Farbstoffe

für analytische Anwendungen

IPC:

C 07 D, C 09 B

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 12. Juli 2004 Deutsches Patent- und Markenamt Der Präsident Im Auftrag

Stanschus

A 9161 06/00 EDV-L

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

Unser Zeichen:

30554P DE/MDpuwr

Anmelder:

ATTO-TEC GmbH Schanzenweg 50 57076 Siegen

Sulfonamidderivate polycyclischer Farbstoffe für analytische Anwendungen

Sulfonamidderivate polycyclischer Farbstoffe für analytische Anwendungen

Beschreibung

5

10

15

Die Erfindung betrifft die Herstellung von Sulfonsäuregruppen-haltigen Chinolinverbindungen, die Chinolinverbindungen selbst sowie deren Umsetzung zu Sulfonsäuregruppen-enthaltenden Farbstoffen. Die erfindungsgemäßen Farbstoffe finden insbesondere Anwendung zur Markierung von Analyten, beispielsweise zur Markierung von Biomolekülen.

Farbstoffe aus der Klasse der Cumarin-, der Xanthen-, der Oxazinfarbstoffe sowie verwandte Derivate werden aufgrund ihrer sehr guten spektralen Eigenschaften. insbesondere ihrer Fluoreszenz, bevorzugt in der chemischen. biologischen und medizinischen Analytik als Markierungsgruppen eingesetzt (J. Slavik, Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994). Eine große Anzahl von langwelligen Xanthen-Farbstoffen (Rhodamine etc.) werden beschrieben in EP 0567622 B1. Markierungsfarbstoffe aus der Klasse der Oxazine werden offenbart in EP 0747447 B1. Sulfonsäurederivate von Xanthen-Farbstoffen sind beschrieben in WO 99/15517. Farbstoffe aus den Klassen der Carbopyronine und Amidopyrylium-Farbstoffe werden beschrieben in WO 00/64986 und WO 00/64987. Dabei spielen vor allem Farbstoffe mit einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute eine wichtige Rolle, da über die Fluoreszenz ein sehr empfindlicher Nachweis des markierten Analyten möglich ist. Aber auch nicht-fluoreszierende Derivate gewinnen zunehmend als Quencher in speziellen Verfahren Bedeutung.

Zur Verwendung als Markierungsgruppen für Analyte ist neben einer einfachen und zuverlässigen Nachweisbarkeit eine gute Löslichkeit, z.B. in wässrigen Systemen, erforderlich. In anderen Fällen ist, gerade umgekehrt, gute Löslichkeit in unpolarer Umgebung, z.B. Zellmembranen, erwünscht.

Von entscheidender Bedeutung für die Anwendbarkeit als Markierungsgruppen für Analyte oder in ähnlichen Verfahren sind also je nach den konkreten Bedingungen bestimmte spezifische Eigenschaften, über die der Fluorophor zusätzlich zu seinen optischen Eigenschaften verfügen sollte. Diese sind bei den Farbstoffen der genannten Patente entweder gar nicht oder, wenn überhaupt, nur sehr umständlich durch Farbstoffsynthese unter Verwendung entsprechender Edukte zu erreichen.

10

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, bestimmte physikalische und/oder chemische Eigenschaften – etwa die Löslichkeit in bestimmten Medien, die Tendenz zu unspezifischen Wechselwirkungen mit Substraten und/oder Gefäßwänden oder Kopplungsfähigkeit – dieser Farbstoffe in einfacher Weise – auch nachträglich – zu modifizieren, ohne die sehr guten spektralen Eigenschaften der Farbstoffe wesentlich zu verändern.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Darstellung von Verbindungen der allgemeinen Formeln I a und I b

20

$$\begin{matrix} R_5 & CH_2SO_2X \\ R_7 & R_4 \\ R_7 & R_8 & R_1 \end{matrix}$$

lb

Sowie ihre Verwendung zur Darstellung von Farbstoffen, die z.B. als Markierungsgruppen in einem Verfahren zum Nachweis von Analyten eingesetzt werden können, wobei

R₁ Wasserstoff oder eine gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen, z.B. Polyether, Phenyl, Phenylalkyl mit 1-3 C-Atomen in der Kette bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen gegebenenfalls Heteroatome, wie Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome, oder/und einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Phospho-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können.

R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ und R₈ jeweils unabhängig Wasserstoff, Halogen, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo- oder Carboxy- oder Aldehydgruppe oder eine gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Cycloalkyl-, Aryl, insbesondere Phenyl-, oder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls auch Heteroatome, wie Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome, oder/und mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Phospho-, Sulfo-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können, oder der Rest R_8 mit R_1 ein Ringsystem bilden, das eine oder mehrere Mehrfachbindungen enthalten kann, und

X Halogen, eine Hydroxy-, Alkoxy-, Alkylthio- oder Aminogruppe bedeuten, wobei die gegebenenfalls vorhandenen Kohlenwasserstoffreste dieser Gruppen insbesondere Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Cycloalkyl-, Aryl, insbesondere Phenyl-, oder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls auch Heteroatome, wie Sauerstoff-, Schwefeloder Stickstoffatome, oder/und mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Phospho-, Sulfo-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können.

Bei bevorzugten Ausführungsformen bedeutet R_1 einen Aryl- oder Alkylrest, R_2 und R_3 jeweils Methyl und R_4 Wasserstoff.

30

15

20

25

.>

In weiteren besonders bevorzugten Formen bedeutet R_1 einen Aryl- oder Alkylrest, R_2 und R_3 jeweils Methyl, R_4 Wasserstoff und R_7 eine Hydroxy-oder Methoxygruppe.

5

15

20

In noch weiteren besonders bevorzugten Formen bedeutet R_1 einen Aryloder Alkylrest, R_2 und R_3 jeweils Methyl, R_4 Wasserstoff und R_6 eine Nitroso-, Formyl- oder eine Hydroxymethylgruppe.

In einer weiteren besonders bevorzugten Verbindungsklasse sind R_1 mit R_8 verbrückt und bilden ein Ringsystem, insbesondere einen 5- oder 6- gliedrigen Ring.

Die vorzugsweise verwendeten bzw. dargestellten Farbstoffe sind Vertreter der nachfolgend zusammengestellten Klassen - aber nicht auf diese Klassen beschränkt- der allgemeinen Formeln II - VII. Bei Farbstoffen der Klassen III und V – VII, die über ein symmetrisches chromophores System verfügen, ist es erfindungsgemäß durch Wahl der Edukte möglich, zwei – gleiche oder verschiedene – SO₂X-Gruppen einzuführen. Durch nachträgliche Hydrierung ist es in gleicher Weise wie bei den Edukten I möglich, entsprechende Farbstoffe mit Tetrahydrochinolin-Endgruppen herzustellen.

II Cumarine

III Xanthenfarbstoffe Y = O, S, Se

IV Rhodol-Farbstoffe

wobei R insbesondere = H, (subst.) Aryl, (subst.) Carboxyphenyl, (subst.) Alkyl, (subst.) Cycloalkyl, (subst.) Pyridyl, (subst.) Carboxypyridyl etc.

25

30

35

Erfindungsgemäß können entweder entsprechende Synthesevorstufen oder die eigentlichen Farbstoffe sulfoniert und anschließend Sulfonsäuregruppe(n) derivatisiert werden. Dazu wird die Sulfonsäure oder ihr Salz bevorzugt in ein Sulfochlorid überführt und dieses anschließend mit einem Nucleophil (z.B. Amino- oder Mercaptogruppe) umgesetzt. Die Sulfonierung gelingt z.B. in konzentrierter Schwefelsäure, gegebenenfalls im Gemisch mit Oleum. Die Sulfonsäurederivate sowohl der Vorstufen als auch der Farbstoffe lassen sich in einfacher Weise mit Phosphoroxychlorid, Phosphorpentachlorid oder Thionylchlorid bevorzugt im Gemisch mit Dimethylformamid zum Sulfochlorid umsetzen. Überraschenderweise können die Sulfochloride in fast allen Fällen problemlos isoliert werden. Die Sulfochloride reagieren mit verschiedenen Nucleophilen, vorzugsweise mit primären oder sekundären Aminen, zu entsprechenden Sulfonamid-Derivaten. Die physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften der so erhaltenen Verbindungen hängen dabei auch ganz entscheidend von der Natur des eingesetzten Amins ab, wie später noch ausführlicher - auch anhand von Beispielen - erläutert wird. Dabei wird eine erstaunlich große Vielfalt von pH-stabilen Sulfonamid-Derivaten erhalten. Die

erfindungsmäßige Art der Sulfonamid-Verknüpfung sorgt für eine räumliche Separation von Substituent und Chromophor und verhindert dadurch einen nachteiligen Einfluss auf die Fluoreszenz-Effizienz. Die Farbstoffsulfochloride können auch – ohne vorherige Derivatisierung – direkt zur Kopplung an nucleophile (NH₂ etc. Gruppen) Gruppen von Analytmolekülen verwendet werden.

Der Begriff Heteroatome, wie hierin verwendet, umfasst insbesondere Sauerstoff-, Schwefel- und Stickstoffatome.

Der Begriff Substituenten umfasst, soweit nicht anders angegeben, insbesondere Halogen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Phospho-, Carboxy-, Alkoxy- sowie Alkoxycarbonylgruppen mit, soweit vorhanden, 1-10 C-Atomen.

Zur Darstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen werden folgende allgemeine Verfahren angewendet. Es können entweder die Vorstufen (Punkt 1) oder die fertigen Farbstoffe (Punkt 2) derivatisiert werden.

1. Synthese entsprechender Vorstufen

20

Ausgehend von einem nach literaturbekannten Methoden, z.B. durch die Kondensation eines Anilinderivats mit Mesityloxid und anschließende N-Alkylierung, dargestellten 7-Alkoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin wird erfindungsgemäß folgendermaßen vorgegangen:

Abbildung 1:

Beispielhafte Darstellung erfindungsgemäßer Verbindungen. Es wird ausgehend von 1-Ethyl-7-methoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin über die Zwischenstufen der Sulfonsäure und des Sulfochlorids schließlich ein Sulfonamid-Derivat erhalten. Durch intermediäre Hydrierung lässt sich das entsprechende 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin-Derivat erhalten.

Durch Verrühren des Dihydrochinolins mit einem Gemisch aus konzentrierter 10 Schwefelsäure und Oleum bei Raumtemperatur erhält man ein an der 4-Methylgruppe sulfoniertes Produkt. Diese Sulfonsäure oder ihr Salz kann leicht in das Sulfochlorid überführt werden. Dazu wird die sulfonierte Verbindung bevorzugt bei Raumtemperatur in Benzol mit Phosphorpentachlorid umgesetzt. Allgemein verwendet man die Darstellung des Sulfochlorids gebräuchliche Reagenzien wie

Phosphoroxychlorid, Phosphorpentachlorid oder Thionylchlorid. Die Reaktion wird in einem wasserfreien inerten Lösungsmittel, vorzugsweise Benzol, ausgeführt.

Das Sulfochlorid kann durch einfache Umsetzung mit fast beliebigen primären und sekundären Aminen in ein entsprechendes Sulfonamid überführt werden. Umsetzungen des Sulfochlorids mit anderen Nucleophilen (Thiole, Alkohole etc.) sind ebenfalls möglich. Gegebenenfalls kann das erhaltene stabile Sulfonamid weiter derivatisiert werden (Verseifung von Carbonestergruppen o.ä.).

Das 1,2-Dihydrochinolin lässt sich z.B. auf der Stufe der Sulfonsäure palladiumkatalysiert mit Wasserstoff hydrieren und so in ein 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin überführen. Dieses hydrierte Chinolin kann anschließend dem gleichen Syntheseweg unterworfen werden (siehe Abbildung 1).

Mit den so erhaltenen Sulfonsäuren, ihren Salzen oder bevorzugt den Sulfonamid-Derivaten werden die nachfolgenden Farbstoffsynthesen nach den dem Fachmann bekannten Darstellungsmethoden durchgeführt:

20

Symmetrische Rhodaminfarbstoffe lassen sich z.B. durch die Kondensation des beschriebenen Sulfonamid-Derivats mit Phthalsäureanhydrid erhalten. Andere Xanthenfarbstoffe, wie z.B. Trifluormethyl-, Pyronin- oder Rosaminfarbstoffe, erhält man durch Kondensation mit den entsprechenden Säureanhydriden (Trifluoressigsäureanhydrid) oder Aldehyden (Benzaldehyd etc.).

Unsymmetrische Farbstoffe erhält man im Falle der Rhodamine z.B. durch die Umsetzung von Phthalsäureanhydrid mit einem Aminophenol oder hydriertem 7-Hydroxy- bzw. 7-Methoxychinolin und die anschließende Umsetzung des gebildeten Benzophenon-Derivats, z.B. mit einem zweiten Dihydro- oder Tetrahydrochinolin, wobei jetzt etwa ein erfindungsgemäßes

Sulfonamid-Derivat zum Einsatz kommen kann.

Die Vertreter anderer Farbstoffklassen, wie z.B. Cumarine, Carbopyronine, Amidopyryliumfarbstoffe, Oxazine usw., lassen sich mit den Sulfonsäuren, ihren Salzen oder den Sulfonamid-Derivaten der erwähnten oder ähnlicher Chinolinvorstufen nach literaturbekannten Methoden herstellen. Das heißt, in den bekannten Syntheseverfahren können die erfindungsgemäßen Verbindungen überraschenderweise problemlos für die Darstellung der Farbstoffe eingesetzt werden.

10

2. Nachträgliche Derivatisierung der Farbstoffe

Erfindungsgemäß können Farbstoffe nachträglich an der 4-Methylgruppe sulfoniert werden. Ein ähnliches Verfahren ist in der Patentanmeldung WO 99/15517 für Xanthenfarbstoffe beschrieben. Überraschenderweise gelingt eine solche nachträgliche Sulfonierung auch bei vielen anderen polycyclischen Farbstoffen. Dadurch vereinfacht sich die Synthese der erfindungsgemäßen Sulfonamidderivate beträchtlich.

Die so erhaltenen sulfonierten Farbstoffe sind erstaunlicherweise ebenfalls — wie oben im Falle der Edukte beschrieben — in Sulfochloride überführbar, ohne dass der Chromophor dabei verändert oder zerstört wird. Hier wird neben Phosphoroxychlorid und/oder Phosphorpentachlorid bevorzugt eine Mischung aus Thionylchlorid und Dimethylformamid verwendet. Die Sulfochloride können als Perchlorate isoliert und gereinigt werden. Die isolierten Farbstoffsulfochloride lassen sich in bekannter Weise direkt als Marker für Aminogruppen in Biomolekülen einsetzen. Die so gewonnenen Sulfochloride können aber auch — wie oben für die Chinolin-Vorstufen beschrieben — mit fast beliebigen primären und sekundären Aminen umgesetzt werden. Man kann auf diese Weise besonders einfach die erfindungsgemäßen Farbstoffe erhalten.

Durch die Einführung der Sulfonsäuregruppe und ihre Derivatisierung werden die spektralen Eigenschaften, wie Absorptions- und Fluoreszenzmaximum, Extinktionskoeffizient sowie die Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe, praktisch nicht beeinflusst.

5

Durch das beschriebene Verfahren kann man aber auf einfache Weise oder sogar nachträglich den Farbstoffen – je nach verwendetem primären oder sekundären Amin – eine Vielfalt neuer Eigenschaften vermitteln. Denn das Amin kann fast beliebige weitere funktionelle Gruppen tragen. So lassen sich z.B. Cyano-, Mercapto-, Halogen-, Sulfonsäure-, Hydroxy-, Alkenyl-Gruppen etc. durch unser Verfahren in den Farbstoff einführen.

Trägt das verwendete Amin z.B. längere Alkylketten, z.B. C_{10} bis C_{30} , so erhöht sich der lipophile Charakter, und die Verbindung ist in unpolaren Medien und Membranen löslich und kann so zum Nachweis von Membraneigenschaften oder zu molekularen Abstandsmessungen eingesetzt werden.

20

Die Wasserlöslichkeit eines Farbstoffs lässt sich verbessern, wenn das Amin wiederum Sulfonoder Phosphonsäuregruppen trägt oder Polyetherketten verfügt. Letztere machen die Verbindung auch in vielen organischen Lösungsmitteln besser löslich. Auch lassen sich dadurch ungewünschte unspezifische Wechselwirkungen Substrat mit Gefäßwänden vermindern. Eine Art cyclischer Polyether stellen die für den fluoreszenzsensitiven Kationennachweis verwendeten Kronenether dar, die als Aza-Derivate auch über die hier beschriebene Methode Farbstoffmoleküle gekoppelt werden können. Ferner lassen sich nach dem beschriebenen Verfahren auch bichromophore Systeme darstellen, in denen Energieübertragung (FRET) zwischen den Chromophoren stattfindet.

30

Trägt das Amin Substituenten, die zur kovalenten Kopplung fähig sind, z.B. –COOH, -NH₂, -OH oder/und –SH, so kann die erfindungsgemäß hergestellte

Verbindung nach bekannten Methoden an einen Träger und/oder an ein Biomolekül gekoppelt werden. Durch dieses Vorgehen können somit Farbstoffe zur Markierung verwendet werden, die an sich nicht über eine kopplungsfähige Carboxylgruppe o.ä. verfügen, wie es bei den in WO 99/15517 beschriebenen Sulfonsäurederivaten noch erforderlich ist. Als Träger kann jedes geeignete Material ausgewählt werden, z.B. poröses Glas, Kunststoffe, Ionenaustauscherharze, Dextrane, Cellulose, Cellulosederivate oder/und hydrophile Polymere. Die Biomoleküle werden vorzugsweise ausgewählt aus Peptiden, Polypeptiden, Nukleotiden, Nukleosiden, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga oder/und Haptenen.

10

30

Eine gängige Methode zur kovalenten Markierung von Biomolekülen ist die dem Fachmann vertraute Aktivestermethode. In einer bevorzugten Weise wird deshalb als Amin eine Carbonsäure mit terminaler Aminogruppe und mittlerer Kettenlänge eingesetzt. So lassen sich z.B. die käufliche 4-Methylaminobuttersäure, 4-Piperidincarbonsäure, 6-Aminohexansäure usw. als Amin in erfindungsgemäßer Weise einsetzen. Man erhält nach der Sulfonamidverknüpfung also Farbstoffe, die über eine koppelbare Carboxylgruppe verfügen. Nach der Ankopplung an primäre Aminogruppen geeigneter Biomoleküle lässt sich die verwendete Markierungsgruppe und damit der Analyt leicht durch ihre Absorption und/oder Fluoreszenz nachweisen.

Die erhaltenen Verbindungen können als Markierungsgruppen und damit der Analyt in Verfahren zur qualitativen oder/und quantitativen Bestimmung eines Analyten verwendet werden. Die Bestimmung kann in wässrigen Flüssigkeiten, z.B. Proben von Körperflüssigkeiten, wie etwa Blut, Serum, Plasma oder Urin, Abwasserproben oder Lebensmitteln, durchgeführt werden. Das Verfahren kann sowohl als Nasstest, z.B. in einer Küvette, oder als Trockentest auf einem entsprechenden Reagenzträger durchgeführt werden. Die Bestimmung der Analyten kann dabei über eine einzige Reaktion oder durch eine Sequenz von Reaktionen erfolgen. Die

Verwendung der erhaltenen Verbindungen zeigt dabei sehr gute Ergebnisse in chemischen und insbesondere in medizinischen und biologischen Nachweisverfahren zur Bestimmung eines Analyten.

Die Verbindungen können in allen bekannten chemischen, medizinischen und biologischen Nachweisverfahren, in denen Fluoreszenzfarbstoffe als Markierungsgruppen geeignet sind, verwendet werden. Derartige Verfahren sind dem Fachmann bekannt und müssen deshalb nicht weiter ausgeführt werden.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die erhaltene Verbindung kovalent an einen für den nachzuweisenden Analyten spezifischen Rezeptor gekoppelt. Der spezifische Rezeptor ist jede geeignete Verbindung oder jedes geeignete Molekül, vorzugsweise ist es ein Peptid, Polypeptid oder eine Nukleinsäure. Die Verbindungen oder Konjugate dieser Verbindungen können beispielsweise in Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren oder immunchemischen Verfahren verwendet werden. Derartige Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor.

20

25

Ein wesentlicher Vorteil des beschriebenen Verfahrens. die uneingeschränkte Anwendbarkeit auf alle Farbstoffe, für deren Synthese die oben beschriebenen Di- und Tetrahydrochinoline verwendet werden können. Man ist also in der Lage, durch die Auswahl des Chromophors genau die Farbstoffe auszuwählen, die aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften, der Lage der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima, der Löslichkeitseigenschaften, der Fluoreszenzabklingzeit und der Höhe der Quantenausbeute für die gewünschte Anwendung besonders geeignet erscheinen.

30

Die Herstellung von erfindungsgemäßen Verbindungen gelingt nach den vorne beschriebenen Methoden in einfacher und kostengünstiger Weise, wie

in den nachfolgenden Beispielen erläutert wird. Die so hergestellten Verbindungen sind unproblematisch handhabbar und zeigen eine gute Stabilität und Lagerfähigkeit.

Die Erfindung betrifft somit insbesondere die Herstellung und Verwendung von Dihydrochinolin- und Tetrahydrochinolin-Derivaten entsprechend Formeln la und lb mit X = OH (Sulfonsäuren); X = Cl, Br, I (Sulfonylhalogenide, bevorzugt Chloride); X = NR₁R₂ mit R₁ und R₂ = substituiertes Alkyl, Aryl etc. (Sulfonamide); X = OR oder SR mit R = Alkyl, Aryl etc. (Sulfonsäure-S-Ester), sowie die Verwendung von Verbindungen entsprechend Formeln la und lb zur Herstellung polycyclischer Farbstoffe entsprechend Formeln II – VII.

Die Erfindung umfasst weiterhin die Herstellung und Verwendung polycyclischer Farbstoffe entsprechend Formeln II — VII durch direkte Einführung von ein oder mehreren Substituenten SO_2X in bekannte Farbstoffe mit Dihydrochinolin- oder Tetrahydrochinolin-Endgruppen, ausgenommen X = OH in Verbindungen entsprechend Formel III mit Y = O und Formel IV.

20

Die Farbstoffe entsprechend Formeln II – VII werden vorzugsweise zur Markierung von Analyten, insbesondere Biomolekülen (Peptide, Nucleotide etc.), über deren NH_2 - bzw. SH-Gruppen eingesetzt.

Die Farbstoffe entsprechend Formeln II – VII mit X = CI (Sulfonylchlorid) können auch zur Kopplung mit Aminogruppen eines Analyten verwendet werden.

Die Erfindung umfasst weiterhin die Verwendung der Farbstoffe entsprechend Formeln II – VII mit $X = NR_1R_2$ und $R_1 = COOH$ -substituiertes Alkyl oder Aryl zur Bildung von Aktivestern (mit z.B. N-Hydroxysuccinimid) und nachfolgende Kopplung an Aminogruppen eines Analyten. Zudem

können die Farbstoffe entsprechend Formeln II – VII zur Kopplung an freie Aminogruppen anderer Farbstoffe (FRET-Pärchen) verwendet werden.

Konkrete Beispiele für erfindungsgemäße Verbindungen sind in den Tabellen 1 bis 3 dargestellt.

Tabelle 1: Chinolylsulfonsäuren und deren Derivate

10

Beispiel	Struktur		
	Struktur	Summenformel	Masse MH+
1	SO ₃ H H ₃ CO (CH ₂) ₃ CO ₂ C ₂ H ₅	C ₁₉ H ₂₇ NO ₆ S	398
2	H ₃ CO (CH ₂) ₃ CO ₂ C ₂ H ₅	C ₁₉ H ₂₉ NO ₆ S	400
3	H ₃ CO N CH ₃	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄ S	300
4	HO CH ₃	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S	286
5	ON SO ₃ H	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	315

6	H ₃ CO N (CH ₂) ₄ SO ₃ H	C ₁₇ H ₂₇ NO ₇ S ₂	421
7	H ₃ CO N H	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S	286
8	SO ₃ H	C₁₄H₁₃NO₃S	284
9	SO ₂ CI	C₁₄H₁8CINO₂S	302
10	SO ₂ N O-CH ₃	C ₂₁ H ₃₀ N ₂ O ₄ S	407
11	C ₂ H ₅ C ₂ H ₅ C ₂ H ₅	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₂ S	337
12	SO ₂ NHC ₈ H ₁₇	C ₂₂ H ₃₆ N ₂ O ₂ S	393

13	SO ₂ N O-CH ₃	C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₅ S	435
14	HO C ₂ H ₅	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₅ S	437
15	H ₃ CO N C ₂ H ₅	C₁₅H₂₁NO₄S	312
16	H ₃ CO N C ₂ H ₅	C ₁₅ H ₂₂ CINO ₃ S	330
17	SO ₂ N O-CH ₃ H ₃ CO N C ₂ H ₅	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₅ S	437
18	HO C ₂ H ₅	C ₁₄ H ₁₉ NO ₄ S	298
19	H ₃ CO N CH ₃	C₁₄H₂₀CINO₃S	318

20	SO ₂ N O-CH ₃	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₅ S	425
21	SO ₂ NHC ₈ H ₁₇ H ₃ CO CH ₃	C ₂₂ H ₃₈ N ₂ O ₃ S	411
. 22	SO ₂ N CH ₃ CCH ₃ CCH ₃	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₄ S	395
23	OH H OHOH CH ₂ OH CH ₃ CH ₂ OH CH ₂ OH CH ₂ OH	C ₂₁ H ₃₄ N ₂ O ₄ S	459
24	SO ₂ N CH ₃ CCH ₃	C ₁₈ H ₂₉ N ₃ O ₂ S	352
25	SO ₂ N CH ₃ C ₂ H ₅	C ₃₃ H ₅₈ N ₂ O ₂ S	547
26	$C_{10}H_{21}$ $C_{10}H_{21}$ $C_{10}H_{21}$	C ₃₄ H ₆₀ N ₂ O ₂ S	561

27	SO ₂ N SH	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₂ S ₂	397
28	SO ₂ N OH OH C ₂ H ₅	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₄ S	369
29	SO ₂ N SO ₃ H SO ₃ H	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₈ S ₃	497
30	SO ₂ N O O O O O O O O O O O O O O O O O O O	C ₂₄ H ₃₈ N ₂ O ₆ S	483
31	H ₃ C NH SO ₂ S OH C ₂ H ₅	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₅ S ₂	427
32	SO ₂ S OH	C ₁₆ H ₂₃ NO ₂ S ₂	341
33	SO ₂ S N C ₂ H ₅	C ₁₉ H ₂₉ NO ₂ S ₂	367

Tabelle 2a:

Cumarinfarbstoffe mit Sulfonsäure-Gruppe

Spektrale Daten in Ethanol:

 λ_{a} Absorptions maximum,

5

 λ_f Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur	λ_a / nm	λ _f /nm
34 AZ 59	HO ₃ S	394	468
35 AZ 100	HO ₃ S	383	455
36 AZ 101	HO ₃ S (CH ₂) ₃ CO ₂ H	394	469

Tabelle 2b:

Rhodaminfarbstoffe mit Sulfonsäure-Gruppe

Spektrale Daten in Ethanol:

 $\lambda_{\!\scriptscriptstyle \alpha}$ Absorptions maximum,

 λ_{f} Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ _a / nm	λ _f /nm
37 JA 317	HO ₃ S CO ₂ H SO ₃ H	592	612

38 JA 325	HO ₃ S CI CO ₂ H SO ₃ H	621	642
39 AZ 58	H N O CO ₂ H SO ₃ H	562	587
40 JA 407	CI CI CI CO ₂ H SO ₃ H	623	645
41 JA 407-E	$\begin{array}{c} Cl \\ Cl \\ CO_2Et \\ SO_3H \\ \\ CH_2CH_3 \\ Et = C_2H_5 \end{array}$	623	644

15

Oxazinfarbstoffe mit Sulfonsäure-Gruppe

Spektrale Daten in Ethanol:

 λ_{a} Absorptions maximum,

 $\lambda_{\!\!\!\!/}$ Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	$\lambda_{\rm f}$ / nm
42 JA 378	SO ₃ H (CH ₂) ₃ CO ₂ H	655	680
43 JA 379	SO ₃ H (CH ₂) ₃ CO ₂ H	675	699
44 JA 322	N SO ₃ H	674	699
45 JA 324-S	SO ₃ H N (CH ₂) ₃ CO ₂ H	673	698
46 JA 326	N SO ₃ H (CH ₂) ₃ CO ₂ H	655	679
47 JA 329	HO ₃ S SO ₃ H + SO ₃ H (CH ₂) ₃ CO ₂ H	654	678

48 JA 410	HO ₃ S SO ₃ H (CH ₂) ₃ CO ₂ H	694	717
49 JA 331	SO ₃ H (CH ₂) ₄ SO ₃ H	674	695
50 JA 366	SO ₃ H (CH ₂) ₃ CO ₂ H	654	678
51 JA 403	NO N	653	676
52 JA 404	NO THE SO ₃ H	678	699
53 JA 408	HO ₃ S N (CH ₂) ₃ CO ₂ H	694	715

Tabelle 2d:

Carbopyroninfarbstoffe mit Sulfonsäure-Gruppe

Spektrale Daten in Ethanol:

 λ_a Absorptions maximum,

 λ_{I} Fluoreszenzmaximum

5

Name	Farbstoff (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ _f / nm
54 JA 323	HO ₃ S N (CH ₂) ₃ CO ₂ H	637	664
55 AZ 30	SO ₃ H + N (CH ₂) ₃ CO ₂ C ₂ H ₅	648	675
56 AZ 31	SO ₃ H	648	674
57 AZ 35	HO ₃ S +	649	674
58 AZ 8- SO₃H	HO ₃ S	641	666
59 AZ 9- SO₃H	SO ₃ H	647	675
60 AZ 10- SO₃H	H _E O ₃ H	637	664

61 AZ 11- SO₃H	HO ₃ S SO ₃ H	664	688
62 AZ 12- SO₃H	SO ₃ H	647	674

Tabelle 2e:

5 Amidopyryliumfarbstoffe mit Sulfonsäure-Gruppe

Spektrale Daten in Ethanol:

 λ_{a} Absorptions maximum,

 λ_f Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ _f / nm
63 NK 32	HO ₃ S	635	695
64 NK 34	HO ₃ S	610	668

20 Tabelle 3a:

Sulfonsäurederivate erfindungsgemäßer Cumarinfarbstoffe

Spektrale Daten in Ethanol:

 λ_{α} Absorptionsmaximum,

 $\lambda_{\!\scriptscriptstyle f}\, Fluoreszenzmaximum$

Name	Struktur	λ_a /nm	<u>λ</u> / nm
65 AZ 96	CIO ₂ S	394	468
66 AZ 97	H ₃ CO NO ₂ S	393	468
67 AZ 98	NO ₂ S	394	467
68 AZ 99	H ₁₇ C ₈ NO ₂ S H	393	469

Tabelle 3b:

5

Sulfonsäurederivate erfindungsgemäßer Rhodaminfarbstoffe

Spektrale Daten in Ethanol:

 $\lambda_{\mathtt{a}}$ Absorptions maximum,

 $\lambda_{\!\scriptscriptstyle f}$ Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A-)	λ _a / nm	λ _f /nm
69 AZ 49	CO ₂ H SO ₂ N OH	542	567

70 AZ 50	CO ₂ H SO ₂ N OH	561	587
71 AZ 84	CI CI CO_2Et SO_2CI $Et = C_2H_5$	624	644
72 AZ 85	CI CI $CO_{2}Et$ $SO_{2}N-C_{8}H_{17}$ $Et = C_{2}H_{5}$	624	644
73 AZ 86	CI CI CO_2Et SO_2N OCH_3 $Et = C_2H_5$	624	645
74 AZ 88	CI $CO_{2}Et$ $SO_{2}N$ $OH H OH OH$ $H OH H H$ $Et = C_{2}H_{5}$	623	644

	- 27 -		
75 AZ 89	CI CI CO_2Et SO_2N CH_3 CH_3 CH_3 CH_3 CH_3 CH_3 CH_3	624	644
76 AZ 90	Cl Cl $CO_{2}Et$ $SO_{2}N$ O O $Et = C_{2}H_{5}$	624	645
77 AZ 87	$\begin{array}{c} Cl \\ Cl \\ CO_2Et \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\$	624	644
78 AZ 93	CI $CO_{2}Et$ $SO_{2}N$ $C_{18}H_{37}.$ $Et = C_{2}H_{5}$	624	644
79 AZ 94	CI $CO_{2}Et$ $SO_{2}N$ $C_{10}H_{21}$ $Et = C_{2}H_{5}$	624	646

80 AZ 95	CI CO_2Et SO_2N SH $Et = C_2H_5$	624	644
81 AZ 91	CI CI CI CO_2Et SO_2N OH $Et = C_2H_5$	624	646
82 AZ 92	CI CI CO_2Et SO_3H SO_3H $Et = C_2H_5$	624	644

10 Tabelle 3c:

Sulfonsäurederivate erfindungsgemäßer Oxazinfarbstoffe

Spektrale Daten in Ethanol:

 $\lambda_{\mathtt{a}}$ Absorptions maximum,

 $\lambda_{\!\scriptscriptstyle f}$ Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ _i /nm
83 AZ 46	SO ₂ CI	654	680

84 JA 403 ME	SO ₂ OCH ₃	654	679
85 AZ 54	SO ₂ N-C ₈ H ₁₇	653	677
86 AZ 55	SO ₂ N-\ N	654	679
87 AZ 56	SO ₂ N OCH ₃	653	678
88 AZ 52	SO_2N OC_2H_5	678	699
89 AZ 57	SO_2N O	653	677
90 AZ 102	SO ₂ N H	654	678

91 AZ 73	SO ₂ N (CH ₂) ₃ CO ₂ H	678	717
92 AZ 74	SO ₂ N OH H OH O	678	715
93 AZ 75	SO ₂ N CH ₃ CH ₃	679	715
94 AZ 76	SO ₂ N O O	678	715
95 AZ 77	SO ₂ N OH	678	716
96 AZ 78	SO ₂ N SO ₃ H SO ₃ H	677	714

97 AZ 79	SO ₂ N C ₁₈ H ₃₇	678	716
98 AZ 80	$\begin{array}{c} C_{10}H_{21} \\ C_{10}H_{21} \end{array}$	678	715
99 AZ 81	SO ₂ N SH	679	715

15

Tabelle 3d:

Sulfonsäurederivate erfindungsgemäßer Carbopyroninfarbstoffe

Spektrale Daten in Ethanol:

 λ_{α} Absorptions maximum,

 $\lambda_{\!\scriptscriptstyle f}\, Fluoreszenz maximum$

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ _f / nm
1 00 AZ 48	SO ₂ N OCH ₃	634	658

101 AZ 64	SO ₂ N (CH ₂) ₃ CO ₂ H	635	661
102 AZ 65	SO ₂ N OH H OH O	634	661
103 AZ 66	SO ₂ N CH ₃ N CH ₃	635	663
104 AZ 67	SO ₂ N OOO	635	663
105 AZ 68	SO ₂ N OH	634	662
106 AZ 69	SO ₂ N SO ₃ H SO ₃ H	634	661

107 AZ 70	SO ₂ N C ₁₈ H ₃₇	634	662
108 AZ 71	SO ₂ N C ₁₀ H ₂₁	634	662
109 AZ 72	SO ₂ N SH	635	661
110 AZ 82	SO ₂ N C ₈ H ₁₇	634	661
111 AZ 83	SO ₂ N C ₂ H ₅	635	663

25 Tabelle 3e:

Sulfonsäurederivate erfindungsgemäßer Trifluormethyl-substituierter Xanthenfarbstoffe

Spektrale Daten in Ethanol:

 λ_a Absorptionsmaximum,

λ_f Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ _f / nm
112 AZ 51	H ₃ CO NO ₂ S CF ₃ SO ₂ N OCH ₃	665	694
113 AZ 63	NO ₂ S CF ₃ SO ₂ N OH	664	694
114 AZ 60	CF ₃ SO ₂ N OCH ₃	651	680
115 AZ 62	SO ₂ N OH	652	680
116 AZ 61	CF ₃ SO ₂ N OCH ₃ (CH ₂) ₃ CO ₂ C ₂ H ₅	652	679

Beispiele

Die Erfindung wird durch nachfolgende Beispiele näher erläutert. Es sind sowohl Beispiele für die Herstellung der sulfonierten Chinolinvorstufen und ihre Derivatisierung als auch Beispiele für die Synthese und Modifizierung von Farbstoffen aus den entsprechend sulfonierten Chinolinen angegeben. Die als Ausgangsverbindungen für die unter 1. beschriebenen Verbindungen

verwendeten Dihydro- und Tetrahydrochinoline und primären bzw. sekundären Amine sind entweder kommerziell erhältlich oder nach literaturbekannten Synthesen oder dem Fachmann bekannten Verfahren darzustellen. Dies trifft auch für die Ausgangsfarbstoffe der unter 2. beschriebenen Farbstoffderivate zu.

1. Vorstufen: Herstellung erfindungsgemäßer Verbindungen

Verbindung 8

10

Zur Darstellung (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)von methansulfonsäure (8) werden 6,0 g (21 mmol) 1-Ethyl-2,2,4-dimethyl-1,2dihydrochinolin unter Eiskühlung in einem Gemisch aus 10 ml konzentrierter Schwefelsäure und Oleum im Verhältnis 5:1 gelöst. Es wird 20 Stunden bei Raumtemperatur verrührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eis gegossen und mit 20 %iger Natronlauge unter Eis/Methanol-Kühlung alkalisch gestellt (pH12). Zur Entfernung des nicht umgesetzten Edukts wird mit Chloroform extrahiert und die wässrige Phase bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeengt. Der kristalline Rückstand wird in Ethanol suspendiert, vom Natriumsulfat abgesaugt und die organische Phase am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt. Der harzige Rückstand kristallisiert bei Zugabe von Aceton. Es wird erneut abgesaugt, mit Aceton gewaschen und unter Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt kann ohne weitere Reinigungsschritte in der nächsten Stufe eingesetzt werden.

25 Ausbeute 82 %.

ESI-Massenspektrum: m/z = 282 (MH⁺) NMR (DMSO-d₆): $C\underline{H}_3CH_2$ -, 0.97ppm, T, 3; $-C\underline{H}_2$ -N, 3.39ppm, Q, 2; 2x $C\underline{H}_3$ -, 1.31ppm, S, 6; $=C\underline{H}$, 5.74ppm, S, 1; $-C\underline{H}_2SO_3H$, 4.27ppm, S, 2; \underline{H} aromat, 7.15-7,58ppm, M, 4.

Verbindung 9

Zur Darstellung (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)von methansulfonsäure-chlorid (9) werden 2,5 g (8,8 mmol) (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure (8) in 70 ml trockenem Benzol suspendiert und bei Raumtemperatur portionsweise Phosphorpentachlorid 4,6 g (22,2 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung färbt sich zunächst gelb, später gelborange. Der weiße Niederschlag wird nach 1.5 Stunden abfiltriert und mit kaltem trockenem Benzol gewaschen. Es wird im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Das erhaltene Säurechlorid wird ohne weitere Reinigung sofort in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute 75 %.

10

15

20

25

30

ESI-Massenspektrum: $m/z = 300 (MH^{+})$

Verbindung 10

Zur Darstellung von (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-vlmethansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (10) werden 2 g (6,6 mmol) (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)methansulfonsäurechlorid (9) in 40 ml trockenem Acetonitril gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Man versetzt tropfenweise mit 1,13 g (7,9 mmol) 4-Piperidincarbonsäuremethylester gefolgt von 0,85 (6,6)Diisopropylethylamin. Die Reaktionsmischung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur verrührt. Man versetzt mit Wasser und extrahiert mit Chloroform, wäscht mit 10 %iger kalter Sodalösung und trocknet über wasserfreiem Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt. Ausbeute 82 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 407 (MH^{+})$

Verbindung 13

Zur Darstellung von 1-(1-Ethyl-6-formyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-ylmethan-sulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (13) werden 3 ml trockenes Dimethylformamid im Eis/Methanol Bad auf -10 ℃ gekühlt und tropfenweise mit 0,45 ml (4,9 mmol) Phosphoroxidtrichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wird 20 Minuten bei -5 ℃ verrührt. (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäure-methylester (10) werden in 1,5 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und bei -5 ℃ dem Reaktionsgemisch zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird 50 Minuten auf 80 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wird auf Eiswasser gegossen und mit Chloroform versetzt. Es wird mit 20 %iger Natronlauge auf pH12 eingestellt und mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit 10 % Sodalösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum zur Trockene eingeengt und an Kieselgel über einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute 88 %.

ESI-Massenspektrum: m/z = 435 (MH+)

NMR (CDCl₃): C<u>H₃</u>CH₂-, 1.22ppm, T, 3; -C<u>H₂</u>-N, 3.41ppm, Q, 2; 2x C<u>H₃</u>-, 1.42ppm, S, 6; =C<u>H</u>, 5.63ppm, S, 1; -C<u>H₂</u>SO₂N, 4.00ppm, S, 2; <u>H</u>-5 aromat, 7.59ppm, S, 1; <u>H</u>-7 aromat, 7.57ppm, D, 1; <u>H</u>-8 aromat, 6.55ppm, D, 1; <u>H</u>-C=O, 9.68ppm, S, 1; -O-C<u>H₃</u>, 3.63ppm, S, 1; C<u>H</u>(Piperidin)-C=O, 2.31ppm, M, 1; N-C<u>HH'</u>(Piperidin), 2.83ppm u. 3.52ppm; M, 2,2; HC-C<u>HH'</u>(Piperidin), 1.67ppm u. 1.83ppm; M, 2,2.

Verbindung 14

Zur Darstellung von 1-(1-Ethyl-6-hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (14) werden 1 g (2,3 mmol) 1-(1-Ethyl-6-formyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-

yl-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (13) in 10 ml Ethanol gelöst und unter Eiskühlung mit 0,05g Natriumborhydrid versetzt, wobei eine deutliche Gasentwicklung mit Schäumen zu beobachten ist. Es wird 50 Minuten bei Raumtemperatur verrührt. Zur Zersetzung des Überschusses an Reduktionsmittel wird tropfenweise mit 1 N Salzsäure versetzt bis kein Schäumen mehr zu beobachten ist (pH7). Man gießt auf 50 ml Wasser und extrahiert 3 mal mit 20 ml Chloroform. Die vereinigten organischen Phasen werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis zur Trockene abdestilliert. Der erhaltene Rückstand wird an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute 88 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 435 (MH^{+})$

NMR (CDCl₃): CH₃CH₂-, 1.10ppm, T, 3; -CH₂-N, 3.25ppm, Q, 2; 2x CH₃-, 1.27ppm, S, 6; =CH, 5.53ppm, S, 1; -CH₂SO₂N, 3.96ppm, S, 2; H-5 aromaten, 7.10ppm, S, 1; H-7 aromaten, 7.05ppm, D, 1; H-8 aromaten, 6.46ppm, D, 1; H₂C-OH, 4.47ppm, S, 1; -O-CH₃, 3.57ppm, S, 1; CH (Piperidin)-C=O, 2.29ppm, M, 1; N-CHH'(Piperidin), 2.82ppm u. 3.53ppm; M, 2,2; HC-CHH'(Piperidin), 1.68ppm u. 1.73ppm; M, 2,2; -CH₂-OH, nn.

Verbindung 3

10

Zur Darstellung von (1-Methyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure (3) werden 5,0 g (1-Methyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure werden in 100 ml Methanol gelöst und mit 0,5 g 10 %igem Palladium auf Aktivkohle versetzt. Das Reaktionsgemisch wird im Autoklaven 18 Stunden bei 70 bar und Raumtemperatur hydriert. Man filtriert und engt am Rotationsverdampfer zur Trockene ein. Der erhaltene Feststoff lässt sich ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe einsetzen.

Ausbeute 90 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 270 (MH^{+})$

Verbindung 11

Die Darstellung von N,N-Diethyl-(1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonamid (11) erfolgt analog Verbindung (10) unter Verwendung von Verbindung (9) mit Diethylamin. Die säulenchromatographische Isolierung des Produktes erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 79 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 337 (MH^{+})$

Verbindung 12

Die Darstellung von (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-N-octyl-methansulfonamid (12) erfolgt analog Verbindung (10) unter Verwendung von Verbindung (9) mit n-Octylamin. Die säulenchromatographische Isolierung des Produktes erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 81 %

20 ESI-Massenspektrum: m/z = 393 (MH+)

Verbindung 15

25

30

Zur Darstellung von (1-Ethyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure (15) werden 20 g (8,6 mmol) 1-Ethyl-7-methoxy-2,2,4-dimethyl-1,2-dihydrochinolin unter Eiskühlung in einem Gemisch aus 10 ml konzentrierter Schwefelsäure und Oleum im Verhältnis 5:1 gelöst. Es wird 20 Stunden bei Raumtemperatur verrührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eis gegossen und mit 20 %iger Natronlauge unter Eis/Methanol Kühlung alkalisch gestellt (pH12). Zur Entfernung des nicht umgesetzten Edukts wird mit Chloroform extrahiert und die wässrige Phase zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeengt. Der kristalline Rückstand wird

säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten gereinigt.

Ausbeute 86 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 312 (MH^{+})$

5 NMR (DMSO-d₆): CH₃CH₂-, 1.09ppm, T, 3; -CH₂-N, 3.25ppm, Q, 2; 2x CH₃-, 1.24ppm, S, 6; =CH, 5.28ppm, S, 1; -CH₂SO₃H, 3.43ppm, S, 2; H-5 aromat, 6.04ppm, D, 1; H-6 aromat, 7.17ppm, D, 1; H-8 aromat, 5.93ppm, S, 1; CH₃O-, 3.68ppm, S, 3.

Verbindung 16

Die Darstellung von (1-Ethyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methan-sulfonsäurechlorid (16) erfolgt analog Verbindung (9) aus Verbindung (15) und Phosphorpentachlorid in trockenem Benzol. Das erhaltene Säurechlorid wird sofort zur weiteren Umsetzung eingesetzt. Ausbeute 73 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 330 (MH^{+})$

Verbindung 17

Die Darstellung von (1-Ethyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (17) erfolgt analog Verbindung (10) aus Verbindung (16) in trockenem Acetonitril bei Raumtemperatur.

Ausbeute 69 %.

ESI-Massenspektrum: m/z = 437 (MH+)
NMR (CDCl₃): CH₃CH₂-, 1.15ppm, T, 3; -CH₂-N, 3.27ppm, Q, 2; 2x CH₃-, 1.31ppm, S, 6; =CH, 5.41ppm, S, 1; -CH₂SO₂N, 3.97ppm, S, 2; H-5 aromat, 6.17ppm, D, 1; H-6 aromat, 7.07ppm, D, 1; H-8 aromat, 6.09ppm, S, 1; -O-CH₃, 3.77ppm, S, 1; CH(Piperidin)-C=O, 2.31ppm, M, 1; N-CHH'(Piperidin),

2.82ppm u. 3.63ppm; M, 2,2; HC-C<u>HH'</u>(Piperidin), 1.63ppm u. 1.80ppm; M, 2,2; O=C-OC<u>H₃</u>, 3.63, S, 3.

Verbindung 18

Zur Darstellung von (1-Ethyl-7-hydroxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methan-sulfonsäure (18) werden 5 g (16,1 mmol) (1-Ethyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure (16) in 10 ml 48 %iger Bromwasserstoffsäure suspendiert und 2 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Man gießt auf Eis, versetzt mit Chloroform und neutralisiert mit 20 %iger Natronlauge. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase am Rotationsverdampfer im Vakuum zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wird in heißem Ethanol suspendiert, filtriert und das Filtrat erneut bis zur Trockene einrotiert. Das so erhaltene Produkt wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute 91 %.

10

ESI-Massenspektrum: $m/z = 298 (MH^{+})$

15 Verbindung 19

Die Darstellung von (1-Methyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2,3,4tetrahydrochinol-4-yl)-methansulfonsäurechlorid (19)erfolat analog Verbindung (16) unter Verwendung von Verbindung (3) und Phosphorpentachlorid mit dem Unterschied, dass 18 Stunden bei Raumtemperatur verrührt wird.

Ausbeute 78 %.

ESI-Massenspektrum: m/z = 317 (MH+)

25 Verbindung 20

Die Darstellung von (1-Methyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinol-4-yl-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (20) erfolgt analog Verbindung (10) aus Verbindung (19) mit 4-Piperidincarbonsäuremethylester in trockenem Acetonitril. Die

säulenchromatographische Isolierung erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 69 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 425 (MH^{+})$

Verbindung 21

5

Die Darstellung von (1-Methyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinol-4-yl)-N-octyl-methansulfonamid (21) erfolgt analog Verbindung (10) aus Verbindung (19) mit n-Octylamin in trockenem Acetonitril. Die säulenchromatographische Isolierung erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten. Ausbeute 69 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 411 (MH^{+})$

5 2. Farbstoffe: Herstellung erfindungsgemäßer Verbindungen

Verbindung 55 (AZ 30)

1,2 g (4,93 mmol) 4-(6-Hydroxymethyl-2,2,4-trimethyl-2H-chinol-1-yl)-buttersäure-ethylester werden zusammen mit 0,72 g (4,93 mmol) 1-Ethyl-6-isopropenyl-indolin in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst und auf -5 °C gekühlt. Man versetzt tropfenweise mit 7 ml einer 1 molaren Lösung von Bortrichlorid in Dichlormethan. Das Reaktionsgemisch wird 2 Stunden bei Raumtemperatur verrührt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in konzentrierter Schwefelsäure gelöst. Die Reaktionsmischung wird 4 Stunden bei Raumtemperatur verrührt. Man tropft in eiskaltes Ethanol, versetzt mit 0,8 g Tetrabutylammoniummetaperiodat und erhitzt kurz zum Sieden. Man lässt abkühlen, versetzt mit Wasser und nimmt den Farbstoff in Chloroform auf. Es wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und die Farbstofflösung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt. Das erhaltene Farbstoffrohprodukt wird an Kieselgel mit einem

von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute 45 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 565 (M^{+})$

5 Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 648 \text{ nm}$ (in Ethanol)

Verbindung 83 (AZ 46)

100 mg (0,21 mmol) JA 403 werden in 8 ml trockenem Acetonitril gelöst und im kalten Wasserbad gekühlt. Man versetzt mit 4 Tropfen trockenem Dimethylformamid gefolgt von 6 Tropfen frisch destilliertem Thionylchlorid. Es wird 45 Minuten verrührt. Die Umsetzung erfolgt quantitativ. Das Reaktionsgemisch wird in einem Eisbad gekühlt. Die Farbstofflösung wird in eine mit Eis/Methanol gekühlte 20 %ige Natriumperchloratlösung getropft.

Der sich in feinen Kristallen abscheidende Farbstoff wird abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Der Farbstoff kann ohne zusätzliche Reinigung für weitere Umsetzungen eingesetzt werden.

Ausbeute 81 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 502 (M^+)$

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 650 \text{ nm}$ (Acetonitril)

Verbindung 90 (AZ 102)

10 mg (0.017 mmol) AZ 46 werden in 5 ml trockenem Acetonitril gelöst und mit 5 ml einer 10 mmolaren Lösung aus Benzylamin in trockenem Acetonitril versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 20 Minuten bei Raumtemperatur verrührt. Die Reaktionslösung wird zur Trockene einrotiert und an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute 88 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 573 (M^{+})$

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 653$ nm (in Ethanol)

Verbindung 87 (AZ 56)

Die Synthese erfolgt analog zur Darstellung von AZ 102 unter Verwendung einer 10 mmolaren Lösung von 4-Piperidincarbonsäuremethylester. Die Isolierung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 91 %.

10 ESI-Massenspektrum: m/z = 609 (M+)

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 652$ (in Ethanol)

Verbindung 89 (AZ 57)

10 mg (0,014 mmol) AZ 56 werden in 20 ml Acetonitril Wasser 1:1 gelöst und mit 0,5 ml 2 N Salzsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wird 7 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Farbstofflösung wird unter Vakuum eingeengt und an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

20 Ausbeute 62 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 595 (M^+)$

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 652 \text{ nm}$ (in Ethanol)

Verbindung 34 (AZ 59)

25

500 mg (1,7 mmol) (1-Ethyl-7-hydroxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydroChinol-4-yl)-methan-sulfonsäure (18), 440 mg (3,4 mmol) Acetessigsäureethylester und 460 mg trockenes Zinkchlorid werden in 40 ml absolutem Ethanol suspendiert und 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wird filtriert, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt und der Rückstand an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute 60 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 364 (MH^{+})$

Absorptions maximum: $\lambda_a = 394 \text{ nm}$ (in Ethanol)

5 Verbindung 71 (AZ 84)

Die Synthese erfolgt analog AZ 46 unter Verwendung von JA 407-E mit Thionylchlorid/DMF in trockenem Acetonitril. Der erhaltene Farbstoff wird als Perchlorat isoliert und getrocknet. Das Farbstoffsulfochlorid kann ohne weitere Reinigung sofort weiter umgesetzt werden.

Ausbeute 81 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 811 (M^+)$

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 623 \text{ nm}$ (in Ethanol)

15 **Verbindung 72 (AZ 85)**

Die Darstellung erfolgt analog AZ 102 unter Verwendung von AZ 84 und n-Octylamin in trockenem Acetonitril. Die säulenchromatographische Isolierung erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 73 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 904 (M^{+})$

Verbindung 65 (AZ 96)

25

20

Die Darstellung erfolgt analog Verbindung (9) aus AZ 59 mit Phosphorpentachlorid in Benzol wobei 6 Stunden bei Raumtemperatur verrührt wird.

Ausbeute 63 %.

30 ESI-Massenspektrum: m/z = 383.2 (MH+)

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 392 \text{ nm}$ (in Ethanol)

Verbindung 66 (AZ 97)

Die Darstellung erfolgt analog AZ 102 aus AZ 96 mit 4-Piperidincarbonsäuresäureethylester. Die säulenchromatographische Isolierung erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 76 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 489.2 (MH^{+})$

Absorptions maximum: $\lambda_a = 393 \text{ nm}$ (in Ethanol)

10

Verbindung 84 (JA 403 ME)

100 mg (0,17 mmol) JA 403 werden mit 0,5 ml Dimethylsulfat in 20 ml trockenem Acetonitril gelöst und für ca. 5 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wird dünnschicht-chromatographisch verfolgt. Nach Beendigung der Umsetzung wird die Reaktionsmischung zur Trockne eingeengt, in wenig Chloroform aufgenommen und der Rückstand an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

20 Ausbeute 70 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 498 (M^+)$

Absorptions maximum: $\lambda_a = 654 \text{ nm}$ (in Ethanol)

Ansprüche

 Verfahren zur Herstellung von Dihydrochinolinverbindungen der allgemeinen Formel la oder von Tetrahydrochinolinverbindungen der allgemeinen Formel lb

5

10

15

20

worin R_1 Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann,

R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ und R₈ bei jedem Auftreten unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy- oder Aldehydgruppe oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, oder die Reste R₁ und R₈ zusammen ein Ringsystem bilden und

X OH, Halogen, -O-R₉, -S-R₁₀ oder -NR₁₁R₁₂ bedeutet, wobei R₉, R₁₀, R₁₁

und R_{12} unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen C1 bis C20 Kohlenwasserstoffrest bedeuten, welcher gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann,

dadurch gekennzeichnet,

5

15

20

25

dass man die entsprechenden Verbindungen I'a

$$R_6$$
 R_7
 R_8
 R_1
 R_4
 R_3
 R_2
 R_3
 R_4

zu la (X = OH) sulfoniert und gegebenenfalls durch Hydrierung zu lb (X = OH) umsetzt.

2. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,

dass man die Sulfonierung mittels konzentrierter Schwefelsäure durchführt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

dass man die bei der Sulfonierung gebildete Sulfonsäuregruppe derivatisiert.

4. Verfahren nach Anspruch 3,

dadurch gekennzeichnet,

dass man die Sulfonsäuregruppe zum Sulfochlorid umsetzt.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet.

dass man die Sulfochloridgruppe mit einem primären oder sekundären Amin zum Sulfonamid umsetzt.

6. Dihydrochinolinverbindung der allgemeinen Formel la oder Tetrahydrochinolinverbindung der allgemeinen Formel lb

5

10

15

20

worin R_1 Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann,

R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ und R₈ bei jedem Auftreten unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy- oder Aldehydgruppe oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, oder die Reste R₁ und R₈ zusammen ein Ringsystem bilden und

X OH, Halogen, -O- R_9 , -S- R_{10} oder -NR₁₁R₁₂ bedeutet, wobei R₉, R₁₀, R₁₁ und R₁₂ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen C1 bis C20 Kohlenwasserstoffrest bedeuten, welcher gegebenenfalls ein oder

mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten, insbesondere - SO_3H , - PO_3H_2 und -COOH enthalten kann.

- Verbindung nach Anspruch 6,
 worin R₁ einen Aryl- oder Alkylrest, insbesondere einen C5 bis C15-Aryloder einen C1 bis C20-Alkylrest darstellt, R₂ und R₃ Methyl sind und R₄
 Wasserstoff bedeutet.
 - Verbindung nach Anspruch 6 oder 7,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass R₇ einen Hydroxy- oder Methoxyrest darstellt.
 - Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass R₆ eine Nitrosogruppe darstellt.

10

15

- 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 7,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass R₅ eine Formyl- oder eine Hydroxymethylgruppe darstellt.
- 11. Verbindung nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass X Halogen, insbesondere CI bedeutet.
- 12. Verbindung nach einem der Ansprüche 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass X den Rest -NR₁₁R₁₂ darstellt, wobei die Reste R₁₁ und R₁₂ wie in Anspruch 6 definiert sind.
- 30 13. Verfahren zur Herstellung von -SO₂X enthaltenden Farbstoffen der allgemeinen Formeln II bis VII

worin R_1 , R_2 , R_3 , R_4 . R_5 und R_8 wie in Ansprüchen 1 bis 12 definiert sind, R bei jedem Auftreten gleich oder verschieden sein kann und wie R_1 , R_2 , R_3 , R_4 . R_5 und R_8 definiert ist und R' bei jedem Auftreten unabhängig

voneinander Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, oder die Reste R und R' zusammen ein Ringsystem bilden, das eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten kann,

R₁₃ bei jedem Auftreten unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, wobei R₁₃ insbesondere Wasserstoff, Aryl, Carboxyphenyl, Alkyl, Perfluoralkyl, Cycloalkyl, Pyridyl oder Carboxypyridyl darstellt,

X OH, Halogen, -O-R₉, -S-R₁₀ oder $-NR_{11}R_{12}$ bedeutet, wobei R₉, R₁₀, R₁₁ und R₁₂ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen C1 bis C20 Kohlenwasserstoffrest bedeuten, welcher gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, und

Y in Formel III O, S oder Se sowie Y in Formel VI O, S oder C(R)₂ bedeutet

dadurch gekennzeichnet.

5

10

15

20

dass man entsprechende Verbindungen der Formeln II' bis VII'

sulfoniert, mit der Maßgabe, dass für Verbindungen der Formel III mit Y = O und Verbindungen der Formel IV X nicht OH bedeutet.

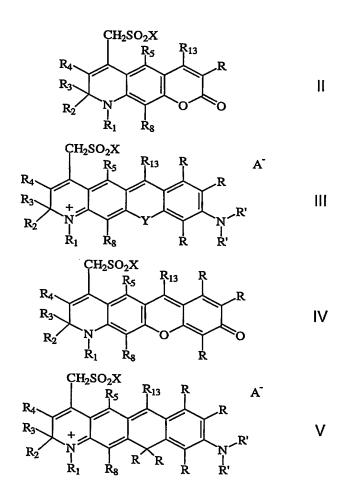
- 14. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 6 bis 12 oder erhältlich gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung von polycyclischen Farbstoffen.
- 15. Verwendung nach Anspruch 14 zur Herstellung von polycyclischen Farbstoffen der Formeln II bis VII.
- 16. Verfahren zur Herstellung polycyclischer Farbstoffe, dadurch gekennzeichnet,

25

30

dass man Verbindungen, welche eine Dihydrochinolinendgruppe mit einer 4-Methylgruppe aufweisen, sulfoniert, — gegebenenfalls zum Tetrahydrochinolin hydriert — mit der Maßgabe, dass der polycyclische Farbstoff keine Verbindung der Formel III mit Y = O und X = OH oder der Formel IV mit X = OH ist.

- 17. Polycyclischer Farbstoff erhältlich gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16.
- 18. Polycyclischer Farbstoff der allgemeinen Formel II bis VII



worin

15

20

25

30

R' Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann,

R bei jedem Auftreten unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy- oder Aldehydgruppe oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, oder die Reste R' und R zusammen ein Ringsystem bilden, das eine oder mehrere Mehrfachbindungen enthalten kann,

R₁₃ bei jedem Auftreten unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, wobei R₁₃ insbesondere Wasserstoff, Aryl, Carboxyphenyl, Alkyl, Perfluoralkyl, Cycloalkyl, Pyridyl oder Carboxypyridyl darstellt,

X OH, Halogen, -O- R_9 , -S- R_{10} oder -NR₁₁R₁₂ bedeutet, wobei R₉, R₁₀, R₁₁ und R₁₂ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen C1 bis C20 Kohlenwasserstoffrest bedeuten, welcher gegebenenfalls ein oder

mehrere Heteroatome oder einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, und

Y in Formel III O, S, oder Se sowie Y in Formel VI O, S oder $C(R)_2$ darstellt,

mit der Maßgabe, dass der Farbstoff keine Verbindung der allgemeinen Formel III mit Y = O und X = OH oder der allgemeinen Formel IV mit X = OH ist.

19. Polycyclischer Farbstoff nach Anspruch 17 oder 18,

dadurch gekennzeichnet,

dass X Halogen, insbesondere CI, bedeutet.

20. Polycyclischer Farbstoff nach Anspruch 17 oder 18,

dadurch gekennzeichnet,

dass X für den Rest $-NR_{11}R_{12}$ steht, wobei die Reste R_{11} und R_{12} wie in Anspruch 18 definiert sind.

21. Polycyclischer Farbstoff nach Anspruch 20,

dadurch gekennzeichnet,

dass R_{11} oder/und R_{12} einen mit -COOH substituierten Alkyl- oder Arylrest darstellt.

22. Verwendung eines Farbstoffs nach einem der Ansprüche 17 bis 21 zur Markierung eines Analyten.

23. Verwendung nach Anspruch 22,

dadurch gekennzeichnet,

dass es sich bei dem Analyten um ein Biomolekül, insbesondere um ein Peptid oder ein Nukleotid, handelt.

24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet.

30

25

dass die Markierung durch Bindung des Farbstoffs an eine NH_2 - oder SH-Gruppe des Analyten erfolgt.

- 25. Verwendung eines Farbstoffs nach Anspruch 19 zur Markierung eines Analyten, wobei die Bindung des Farbstoffs durch Kopplung an eine Aminogruppe des Analyten erfolgt.
- 26. Verwendung eines Farbstoffs nach Anspruch 21 zur Markierung eines Analyten, wobei die Bindung des z.B. als NHS-Ester aktivierten Farbstoffs durch Kopplung an eine Aminogruppe des Analyten erfolgt.
- 27. Verwendung eines Farbstoffes nach einem der Ansprüche 17 bis 21 zur Kopplung an einen weiteren Farbstoff.
- 15 28. Verwendung nach Anspruch 27,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Kopplung über eine Aminogruppe des weiteren Farbstoffs erfolgt und dadurch ein FRET-Pärchen gebildet wird.

20

5



Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Herstellung von Sulfonsäuregruppen-haltigen Chinolinverbindungen, die Chinolinverbindungen selbst sowie deren Umsetzung zu Sulfonsäuregruppen-enthaltenden Farbstoffen. Die erfindungsgemäßen Farbstoffe finden insbesondere Anwendung zur Markierung von Analyten, beispielsweise zur Markierung von Biomolekülen.



wr/ANM/30554PDE-02.07.2003



This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

□ BLACK BORDERS
□ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
□ FADED TEXT OR DRAWING
□ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
□ SKEWED/SLANTED IMAGES
□ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
□ GRAY SCALE DOCUMENTS
□ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
□ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

□ OTHER: _____

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.